DOI:10.11931/guihaia.gxzw202303054

檀香 NDH 脱氢酶基因的克隆、定位与启动子分析

闫海锋[1,2,3]，吕金凤[4]，熊发前[1,2,3]，丘立杭[1,2,3]，
周慧文[1,2,3]，陈兴隆[5]，马国华[6*]
（1. 广西壮族自治区农业科学院，甘蔗研究所，南宁 530007；2. 农业农村部广西甘蔗生物技术与遗传改良重点实验室，南宁 530007；3. 广西甘蔗遗传改良重点实验室，南宁 530007；4. 广西林业集团桂钦林浆纸有限公司，南宁 530012； 5. 广西大学农学院，南宁 530004；6. 中国科学院华南植物园，广州 510650）

摘　要：为研究檀香 NDH 脱氢酶基因的功能和调控机制，以檀香心材为材料，利用 RACE 技术克隆 *SaNDH6* 基因的全长序列，利用实时荧光定量 PCR（RT-qPCR）技术分析其组织和激素处理后的表达模式，在拟南芥原生质体观测其亚细胞定位，利用 PlantCARE 分析 *SaNDH6* 起始密码子 ATG 上游 2 kb 的启动子序列，同时运用 PlantRegMap 预测可能与其结合的转录因子。结果表明：（1）SaNDH6 编码 303 个氨基酸，为疏水蛋白，亚细胞定位于叶绿体。（2）进化树分析表明，檀香 SaNDH6 与木本植物 NDH6 进化关系较近。（3）PlantCARE 分析发现，*SaNDH6* 启动子中除含有 ACE、AE-box、Box 4、G-Box 和 GT1-motif 等大量光响应元件外，同时还有茉莉酸甲酯（MeJA）反应元件 CGTCA-motif 和 TGACG-motif，赤霉素（GA）响应元件 P-box，以及防御和胁迫响应元件 TC-rich repeats 等。（4）通过 PlantRegMap 分析发现，有 76 个转录因子可能与 *SaNDH6* 启动子结合，其中 ERF 家族最多，达到了 40 个。（5）*SaNDH6* 在檀香的根、心材、叶片和愈伤组织中均有表达，其中在叶片中的表达量较高；用 1×10^{-4} mol·L^{-1} 的 MeJA 和 GA_3 分别处理檀香愈伤组织后，*SaNDH6* 的表达均显著升高。综上结果表明，檀香 *SaNDH6* 为核基因编码的蛋白，受光和激素等诱导表达，可能参与檀香逆境胁迫反应的过程。

关键词：檀香，叶绿体，NDH 脱氢酶，亚细胞定位，表达调控
中国分类号：Q943　　　　　　　　　　　　**文献标识码：**A

Molecular cloning, subcellular location and promoter analysis of NDH dehydrogenase gene from *Santalum album*

YAN Haifeng[1,2,3], LÜ Jingfeng[4], XIONG Faqian[1,2,3], QIU Lihang[1,2,3],
ZHOU Huiwen[1,2,3], CHEN Xinglong[5], MA Guohua[6*]
(1. *Sugarcane Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences,* Nanning 530007, China; 2.*Guangxi Key Laboratory of Sugarcane Biotechnology and Genetic Improvement, Ministry of Agriculture and Rural Affairs,* Nanning 530007, China; 3. *Guangxi Key Laboratory of Guangxi Sugarcane Genetic Improvement,* Nanning 530007, China； 4. *Guangxi Forestry Group Guiqinlin Pulp Paper Company, Limited,* Nanning 530012, China; 5. *Agriculture college of*

基金项目：国家自然科学基金（32060358）；广东省重点科技项目（2015B020231008）；广西自然科学基金项目（2019GXNSFAA185005）。
第一作者：闫海锋（1980-），博士，副研究员，主要从事林木分子生物学研究，（E-mail）gstsyhf@163.com。
*通信作者：马国华，博士，研究员，主要从事植物生物技术研究，（E-mail） magh@scib.ac.cn。

Guangxi university, Nanning 530004, China; 6. *China South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences*, Guangzhou 510650, China)

Abstract: In order to investigate the function and regulation mechanism of NDH dehydrogenase gene in *Santalum album*, the technique of RACE was used to amplify the full-length sequence of *SaNDH*6 with heartwood as material. The technique of quantitative real-time fluorescence PCR (RT-qPCR) was employed to analyze its expression in the different tissues and after hormone induction. The subcellular location was determined by *Arabidopsis thaliana* protoplast transient expression. 2 kb *cis*-acting element upstream of start codon ATG was analyzed by PlantCARE online service, and the transcription factors which could bind the *cis*-acting elements was predicted by PlantRegMap software. The results were as follows: (1) SaNDH6 encodes 303 amino acids. It was a hydrophobin and located in chloroplast. (2) The phylogenetic tree analysis indicated that SaNDH6 had a more closely evolutionary relationship with NDH6 from woody plants. (3) In the 2 kb promoter sequence of *SaNDH*6, it contains a large number of light responsive *cis*-acting elements such as ACE, AE-box, Box 4, G-Box and GT1-motif. It also contains abscisic acid (ABA) responsive element ABRE, jasmonic acid methyl ester (MeJA) responsive elements CGTCA-motif and TGACG-motif, gibberellin (GA) responsive elements P-box, ARE *cis*-acting regulatory element essential for the anaerobic induction, and TC-rich repeats element involved in defense and stress responsiveness. (4) There were 76 transcription factors that could bind to the *SaNDH*6 promoter, and among of which, ERF transcription factor was the most (up to 40 TFs). (5) *SaNDH*6 can be expressed in the tissues of roots, stems, calluses and leaves, but had the most abundance mRNA accumulation level in the tissue of leaves. Under 1×10^{-4} mol·L^{-1} MeJA and GA_3 treatments, the expression level of *SaNDH*6 were significantly elevated after 3 h when compared with 0 h, respectively. In conclusion, SaNDH6 was a nucleus gene encoding protein, and its expression was induced by light and some hormones. *SaNDH*6 might be involved in against some defense and stress processes in *S. album*.

Key words: *Santalum album*, chloroplas, NDH dehydrogenase,subcellular location,expression regulation

光合作用中，从 H_2O 到 $NADP^+$的线性电子传递可以同时产生 ATP 和 NADPH，但产生的 ATP/NADPH 不足 1.5，不能满足卡尔文循的需要，这些不足的 ATP 由围绕 PSI 的循环电子传递途径进行补偿（Yamori & Shikanai, 2016）。被子植物中，依赖于 NDH 复合体的电子传递是围绕 PSI 循环电子传递的途径之一，其在植物的光合、呼吸、生长、以及在保护植物免受强光伤害和抵御低温等逆境胁迫中均发挥作用（Tsuyoshi Endoa, 1999; Yamori et al., 2011; Yamori & Shikanai, 2016），因此，NDH 复合体的研究越来越受到关注。Shinozaki 等（1986）和 Ohyama（1996）分别通过烟草（*Nicotiana tabacum*）和地钱（*Marchantia polymorpha*）的叶绿体基因组测序发现了 11 个叶绿体编码的 NDH 基因，虽然这些基因与线粒体 NDH 基因同源，但叶绿体 NDH 主要从铁氧化还原蛋白（Fd）接受电子（Ifuku et al., 2011; Yamamoto et al., 2011; Shikanai, 2016）。进一步研究表明，除过以上 11 个基因外，许多叶绿体 NDH 复合体基因是由其核基因组编码的（Sirpio et al., 2009; Yamori et al., 2011; Shikanai, 2016）。目前在拟南芥中共鉴定了 30 多个 NDH 复合体基因，总体可以分为 5 类（Armbruster et al., 2013; Fan et al., 2015; Peltier et al., 2016），SubA 由 7 个基因组成，其中 4 个由叶绿体基因组编码

（NdhH-NdhK），另外 3 个由核基因组编码（NdhM-NdhO），均与电子传递到辅酶 Q 有关（He 等 2015）；SubM 的 6 个成员（NdhA-NdhG）均由叶绿体基因组编码，它们在膜中构成了复合体臂并参与电子在膜中的传递；SubB（PnsB1-PnsB5）和 SubL（PnsL1-PnsL5）的成员均由核基因组编码，且都是叶绿体 NDH 复合体所特有的组份，SubB 可能与维持 NDH 复合体的稳定有关（Peng et al., 2009; Takabayashi et al., 2009），SubL 可以维持 NDH-PSI 复合体的稳定性（Peltier et al., 2016）；SubED（NdhS、 NdhV、 NdhT 和 NdhU）也由核基因组编码，其能与 SubA 相互作用形成 Fd 结合位点（Yamamoto et al., 2011; Peltier et al., 2016）。高等植物在进化过程中 NDH 与 PSI 形成了复合体，从而提高了电子传递效率并在逆境条件下有利于 NDH 复合体的结构保持稳定，拟南芥 Lhca5 和 Lhca6 在此复合体的形成中起连接作用，并且 Lhca6 还能够稳定 NDH 复合体的结构（Peng et al., 2009）。最近 Otani 等（2018）研究发现，有更多捕光复合体 I 蛋白分子参与了 NDH-PSI 复合体的形成，这些蛋白分子包括 Lhca1、2、3、4，它们通过不同组合而形成 2 个复合体，从而连接 NDH 和 PSI。综上可以看出，目前对 NDH 复合体的结构已有较为深入的研究，但一些组成亚基，特别是与 NDH-PSI 复合体结合并不紧密的组分仍然知之甚少，同时对其功能和调控机制还需进一步探究（Fan et al., 2015）。

檀香（*Santalum album*）是分布于热带和亚热带地区的半寄生性珍贵林木，其木材不仅质地坚韧优良，而且还含有芳香精油，被广泛应用于香料、香薰、雕刻和医药等方面，因此具有很高的经济价值（Baldovini et al., 2011）。当前，关于檀香的研究主要集中在其精油的合成和调控等方面，对于其光合特性的研究十分缺乏。NDH 复合体是檀香光合作用时进行电子传递的重要组分，其有哪些基因组成，这些基因的功能和调控如何。关于这些科学问题目前并不明确。本文以檀香木质部为材料，采用分子生物学相关技术方法，通过檀香 *SaNDH6* 基因的克隆、进化树、亚细胞定位、组织表达模式、启动子顺式作用元件和可能结合的转录因子分析，探讨 SaNDH6 在檀香 NDH 复合体中的具体定位和可能的作用，并分析其表达调控模式和其在逆境胁迫中可能发挥的作用，从而为檀香 NDH 复合体在光合作用以及逆境胁迫中的功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料及处理

檀香叶片、根和心材均取自中国科学院华南植物园檀香种植基地的 7 龄檀香树（至少选择 3 棵正常生长树木进行取材），液氮速冻后带回实验室-80 ℃保存。取檀香嫩枝为外植体进行愈伤组织诱导，诱导方法参照 Singh 等（2015）和 Yan 等（2018）的方法进行。在超净台称取等量檀香愈伤组织置于 MS 液体培养基中，在 25 ℃、100 $r\cdot min^{-1}$ 条件下黑暗培养 24 h，之后分别加入终浓度为 1×10^{-4} $mol\cdot L^{-1}$ 的茉莉酸甲酯溶液（MeJA）和赤霉素溶液（GA_3），分别在 0、3、6 h 取样，液氮速冻后置于-80 ℃保存以提取 RNA。每处理均设置 3 次重复。

1.2 *SaNDH6* 的克隆

采用提取木本植物 RNA 方法（Kolosova et al., 2004）提取檀香心材总 RNA，用 NanoDrop ND-1000 分光光度计（Nanodrop Technologies, Wilmington, NC, USA）和 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测提取 RNA 的质量和完整性。

采用 SMARTer RACE cDNA Amplification Kit（Clontech Laboratories Inc., CA, USA）扩增 *SaNDH6* 的全长序列，用巢式 PCR 进行 RACE 扩增。扩增产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测后进行回收，连接 PMD18-T 载体，转化大肠杆菌 DH-5α，挑取阳性克隆到北京华大基因公司（深圳）测序。基因全长扩增（3′ RACE、5′ RACE 和 ORF）引物见表 1。

表 1 本文使用的引物

Table 1 The primers used in this paper

用途 Use	引物名称 Primer name	序列(5′-3′) Primer sequence (5′-3′)
3′ RACE	*SaNDH6*3′-F1	GGTGAGGCCATTCCAGTTCTT
3′ RACE	*SaNDH6*3′-F2	CACTGGATTTGCACTGCCTGC
5′ RACE	*SaNDH6*5′-R1	ATTCTAGGGTCCGAAGCAACATCC
5′ RACE	*SaNDH6*5′-R2	CAAGGAGGCAGAGATAGTGGTGGT

ORF 扩增	*SaNDH*6ORF-F	GATCCAACGGCTATATAATG
ORF amplification	*SaNDH*6ORF-R	AATCACCACTCAGGGAAAAC
构 建 *SaNDH*6: *pSAT*6-*EYFP*-*N*1 载体	*SaNDH*6F1YFP-F	CGAACGATAGCCATGGTAATGAATGGTGCTTTCAAAT
Construction of *SaNDH6: pSAT6-EYFP-N1* Vector	*SaNDH*6F1YFP-R	TGAGTCCGGACCATGGTATACTTCCTCCGCCAAGAGT
实时荧光定量 RT-qPCR	*SaNDH*6qpcr-F	GCGGCCTTCTCTTGCTTATTA
Real time fluorescent quantitative PCR	*SaNDH*6qpcr-R	ACCTCCCTGTTTCACCAATAAC
	*SaFAB*1*A*(RT-qPCR)-F	AGCAGTTCTCAAAGGAGCTAAA
	*SaFAB*1*A*(RT-qPCR)-R	ACCTTCGTGCGACAACTAAA
	*SaPP*2*C*(RT-qPCR)-F	ACTGACCAGGCAATCCTTTC
	*SaPP*2*C*(RT-qPCR)-R	ATCCATAACCTTCGGCCATTTA
	SaCSA(RT-qPCR)-F	GCCAATATACCGAGGACAGAAG
	SaCSA(RT-qPCR)-R	CAACCGCAAGATCACAAACAG
	*SaFbp*3(RT-qPCR)-F	CCTCGTGTACTGGGAAATGG
	*SaFbp*3(RT-qPCR)-R	GCAAGAACGCAATGCCTAAA
	*SaFbp*2(RT-qPCR)-F	CGAAGCCTGGTTCACTCTATG
	*SaFbp*2(RT-qPCR)-R	AAGCTAAGCCTCTGCAATGT

1.3 *SaNDH6* 的生物信息学分析

*SaNDH*6的理化性质预测用Expy Protparat（https://web.expasy.org/cgibin/ Protparam.htmL），亚细胞定位预测利用 plant-mPlo（http://www.csbio. sjtu.edu. cn/bioinf/plant-multi/）。不同植物NDH亚基的氨基酸序列比对用DNAMAN软件，通过MEGA 6.0的领位相连法（N-J法）建立不同植物*NDH*基因的系统进化树。

1.4 *SaNDH6* 的亚细胞定位

檀香基因组序列从 NCBI 下载，下载序列号为 GCA_002925775.1（Mahesh et al., 2018），参照玉米、水稻和拟南芥基因组数据进行相应注释，然后提取 *SaNDH*6 基因的启动子序列，并用 PlantCARE （http://bioinformatics.psb.ugent.be /webtools /plantcare/html/）进行分析。启动子 TF 结合位点预测利用 PlantRegMap: Plant Regulation Data and Analysis Platform @ CBI, PKU （http://plantregmap.cbi.pku.edu.cn/binding_site_prediction.php）进行分析。

扩增 *SaNDH*6 的 ORF 序列（去除终止密码子），然后利用 In-fusion 技术构建 35*S: SaNDH*6*: pSAT*6*-EYFP-N*1 亚细胞定位载体，测序确认后按照 Yoo 等（2007）的方法进行拟南芥原生质体转化，在 22 ℃、弱光下培养 12 h 后利用激光共聚焦扫描电镜（Zeiss, Jena, Germany）观察并拍照。

1.5 实时荧光定量 PCR 分析

用 1.1 所述的方法分别提取檀香叶片、心材、根和愈伤组织总 RNA，然后用 RNase free DNase I（TaKaRa, Japan）进行处理，以确保无 DNA 污染。用 A_{260}/A_{280} 在 1.9 到 2.1、A_{260}/A_{230} 大于 2.0、且电泳后条带完整的 1 μg RNA 进行反转录。获得的 cDNA 用无核酸酶的水稀释 10 倍后置于-20 ℃备用。

RT-qPCR 用 ABI 7500 Real-time system (ABI, Alameda, CA, USA)进行测定。反应试剂采用 SoAdvanced^{TM} Universal SYBR® Green Supermix detection system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)。反应体系为：SYBR® Green Supermix 5 μL，引物 （1×10^{-5} mol·L^{-1}）各 0.5 μL， cDNA 1 μL，加入 ddH_2O 至总体系达到 10 μL。反应条件为 95 ℃预变性 2 min， 95 ℃变性 15 s，60 ℃退火 1 min，40 个循环。按照 Yan 等（2018）方法选取相应内参基因，不同组织中利用 *SaFAB*1*A*+*SaPP*2*C*，MeJA 处理利用 *SaCSA*+*SaFbp*3，GA 处理利用 *SaPP*2*C*+ *SaFbp*2 作为内参基因，以两个相应内参基因表达量的算术平均值作为内参基因的最终表达量值分别进行校正。每个样品均设置 3 次重复，最后用 $2^{-\Delta\Delta Cq}$ 方法分析定量数据。RT-qPCR 所用引物见表 1。

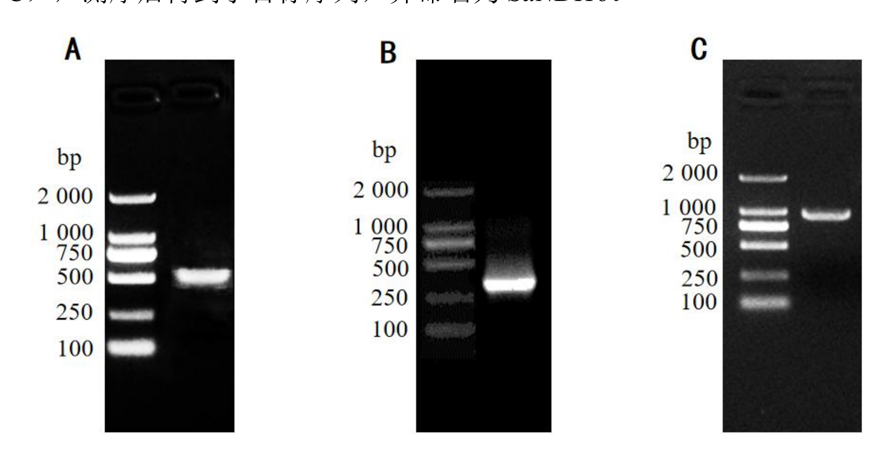
1.6 数据统计分析

用 SPSS 19.0（IBM Corp., Armonk, NY, USA）进行数据统计分析。多重比较采用邓肯式新复极差法（P<0.05）。

2 结果与分析

2.1 *SaNDH6* 的克隆

根据檀香转录组注释的 NDH 脱氢酶 Unigene 设计引物，3′ RACE 扩增后得到一条 528 bp 的特异条带（图 1：A），5′ RACE 扩增后得到一条 317 bp 的特异条带（图 1：B），经测序后均能与已有序列正确拼接，并且在 3′端有 Poly A 序列，说明正确地得到了其 3′和 5′端序列。经 NCBI ORF Finder 分析并拼接后，通过 RT-PCR 扩增后得到了一条 912 bp 的目标条带（图 1：C），测序后得到了目标序列，并命名为 *SaNDH6*。



A. 3′ RACE 扩增产物；**B**. 5′ RACE 扩增产物；**C**. ORF 扩增产物。
A. Amplification product by 3′ RACE; **B**. Amplification product by 5′ RACE; **C**. ORF amplification product.

图 1 *SaNDH6* 的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of *SaNDH6*

2.2 SaNDH6 的生物信息学分析

SaNDH6 编码 303 个氨基酸（图 2），蛋白分子量为 33.75 kDa，理论等电点为 9.31，含有 28 个酸性氨基酸和 45 个碱性氨基酸，带电氨基酸共有 76 个，极性不带电氨基酸共有 79 个，并且含有 160 个疏水氨基酸，说明其为疏水蛋白。亚细胞定位预测表明其可能定位于叶绿体。

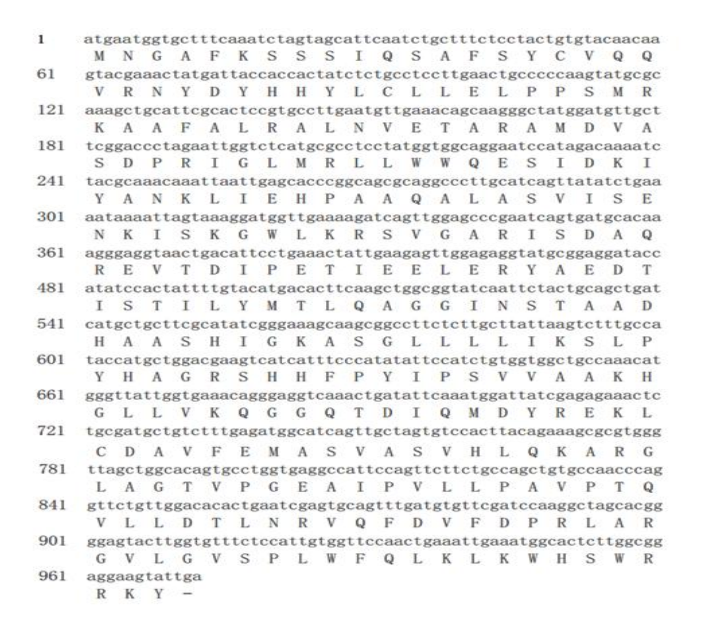


图 2 *SaNDH6* 的 ORF 序列

Fig. 2 ORF sequence of *SaNDH6*

从 NCBI 下载不同植物 NDH 亚基的氨基酸序列，利用 DNAMAN 进行多重序列比对。由图 3 可知，檀香 SaNDH6 与桃（*Prunus persica*）PpNdh6 的序列相似度为 53.46%，与芝麻（*Sesamum indicum*）SiNdh6 的相似度为 52.6%，与木薯（*Manihot esculenta*）MeNdh6 和白牧豆树（*Prosopis alba*）PaNdh6 的相似度均为 51.84%，与葡萄（*Vitis vinifera*）VvNdh6 的序列相似性为 51.3%，说明我们正确地克隆到了檀香 NDH 复合体 6 的基因。

```
SaNDH6    ..............................................................................    0
SiNdh6    ..............................................................................    0
VvNdh6    ...............................MHIATPIAVLGFRIGPSPIFSRGIGWTCSCSQQGGFTFLLPTRSCLNGAESSIALTETLSFVTSFNNY   68
PpNdh6    ..............................................................................    0
PaNdh6    ..............................................................................    0
MeNdh6    ..............................................................................    0
SsNdh6    ..............................................................................    0
Consensus

SaNDH6    ........................................... NG.AFK SSIQS   Y      N   HH   LL    S R A   L  L      55
SiNdh6    ........................................... SG.AST SGVRT   Y      S   HH   LL    N R S   L  F      55
VvNdh6    DPDLFSGTISSTISSLAQTSAFSVCQMSCDSSNGSHWTNPSGYS KG.ASA STIQA   Y      N   HH   NI    N W A   I  F     167
PpNdh6    ........................................... NG.ASA SSLRA   Y      S   YN   LL    N R V   V  L      55
PaNdh6    ........................................... NSASST NSLKA   Y      S   HH   LL    S R A   L  L      56
MeNdh6    ........................................... KG...A NSLRS   Y      S   HH   LL    N R A   F  L      53
SsNdh6    ........................................... NGGSAS N.LRA   H      S   HH   LL    S R A   L  L      55
Consensus                                              m      s     afs cvqqvr ydy  ylc   elpp m k afa ra nvetar

SaNDH6     V    I    L    S   IYANKLI   A    A  IS NKIS G L    G   S  QR VT I . TIEEL R A   I  I  M       154
SiNdh6     I    I    L    A   IFSKRLI   V    A  IS HKVS S L    E   N  KR VS I . TVEEL R A   M  I  S       154
VvNdh6     I    V    L    A   IFANKTI   T    A  VS HKIS G M    E   N  RR VT M . TIEEL R A   V  L  T       266
PpNdh6     V    I    V    A   IYANKLI   T    L  VH NKIS V L    E   S  RK VG T . KIEDL R A   V  L  M       154
PaNdh6     V    I    V    A   IYANKLI   T    S  IG TKLG T L    E   K  RR PT M . TMEEM K S   T  M  L       155
MeNdh6     V    I    L    T   IYANKLV   T    S  IS NRIT G L    E   N  RR VT I . TLEEL K A   V  M  M       152
SsNdh6     V    I    V    A   MFAKKLI   T    S  IA TKIS I L    E   N  RR VT M . TIGEL K A   V  M  L       154
Consensusamd asdpr glmrl wwqe idk       ehp aqal sv  e    k w krsv ari da  e  d p e     e y edt st ly tlqaggi

SaNDH6    N ..........        I     LL  IK      AG SHH P   SVV AK G LVK.Q GQTDIQM YR K  DA FE      SV  Q   G  G   243
SiNdh6    R ..........        I     LV  LK      AS NRH P   VEV EK G LVKDR GQPEIRI SR G  NA FE      NS  E   A  E   244
VvNdh6    R ..........        I     LL  LR      AN NRQ P   KDL AN N LDT.Q GRSEIRM SP G  DV FD      NA  E   Q  G   355
PpNdh6    R ..........        I     LL  IK      GS NRH S   TEV AK G LVK.H GQSEIHL SR G  EA FE      NV  Q   D  G   243
PaNdh6    R ..........        V     IL  LK      IS DRH S   AKV SK R LVK.Q RREEMRL SR A  DA FE      NA  E   K  E   244
MeNdh6    R ..........        V     LL  LR      AS NRH S   TDV TK G LAK.D GRSEVHL SR N  NA FE      NA  Q   A  G   241
SsNdh6    K ..........        I     IL  LK      AS NRL S   TAV SK G IVK.Q GGEERWV SR G  DA YE      NA  E   K  E   243
Consensus s          taadhaash gkasg  ll  slpyh  r   f yip   a  h l     g        d  e lc  v  masva  hl kar la

SaNDH6    T  G  I      V T VL  T NR Q DV   RLAR V  VS    F L     H   R                                    303
SiNdh6    T  A  H      L T VI  T SR Q DV   RLTR I  VL    F M     Y   R                                    304
VvNdh6    T  A  L      V A VI  S SR Q NV   RMAR I  IP    F L     H   G                                    415
PpNdh6    T  V  F      V A VL  S RR N DV   RLAR I  IP    Y L     H   A                                    303
PaNdh6    F  P  V      V A VL  S NR Q DV   RLAR V  VS    Y L     T   R                                    304
MeNdh6    T  A  R      V A IL  S SK Q DA   MLEG V  IP    Y L     A   G                                    301
SsNdh6    N  A  L      V A VL  S SK Q DV   RLTR V  IP    Y L     T   R                                    303
Consensus vp ea pvllpa p q  ld l  v f  fdp    g lg  plw q klkw swr ky
```

图 3 不同植物 NDH6 亚基的多重序列比对

Fig. 3 Multiple sequence alignment of NDH6 subunit from different plants

利用 MEGA 6.0 对不同植物 NDH 亚基的氨基酸序列构建进化树，由图 4 可知，檀香 SaNDH6 与 SiNdh6 和 VvNdh6 聚为一类，这与多重序列比对结果较为一致；同时我们发现 SaNDH6 与葡萄，甜樱桃（*Prunus avium*），川桑（*Morus notabilis*），毛果杨（*Populus trichocarpa*），麻风树（*Jatropha curcas*）和橡胶树（*Hevea brasiliensis*）等木本植物 NDH6 的进化关系均较近。

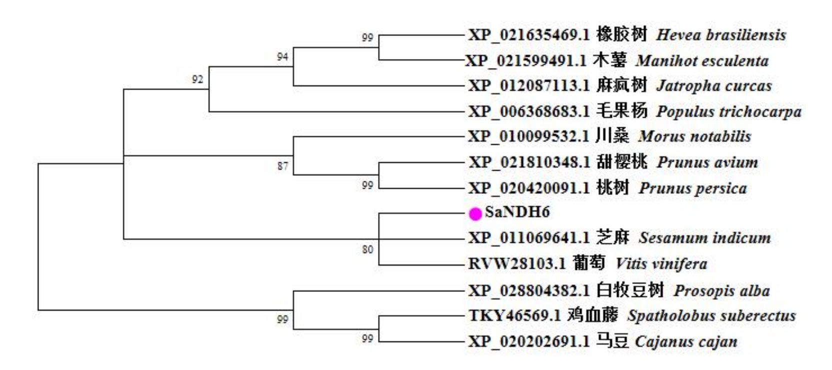


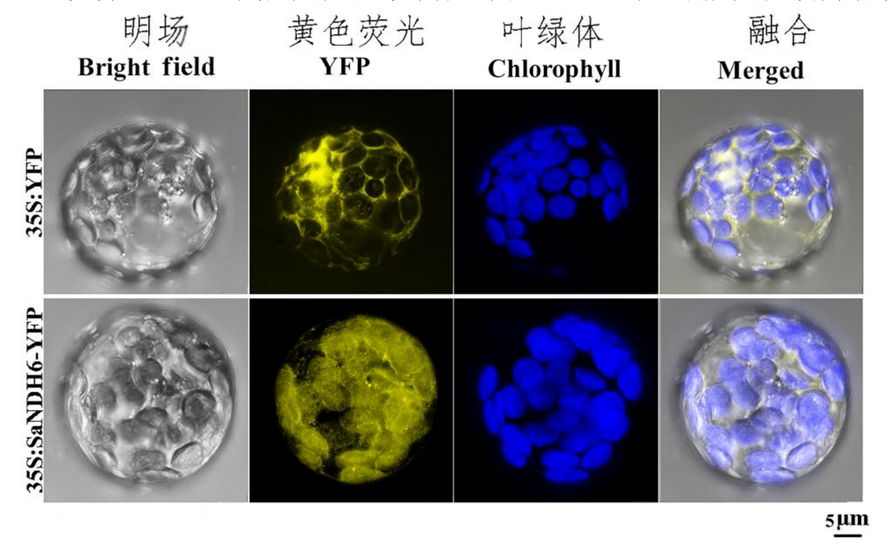
图 4 檀香与不同植物 NDH 亚基的进化树分析

Fig. 4 Phylogenetic tree analysis of NDH subunits from *Santalum album* and different plants

2.3 SaNDH6 的亚细胞定位

将檀香 SaNDH6 亚细胞定位载体瞬时转化到拟南芥原生质体，同时以转化 YFP 空载体为对照，结果发现转化的 35S: SaNDH6: pSAT6-EYFP-N1 和 YFP 空载体均出现黄色荧光蛋

白，说明转化过程是可靠的。35S: SaNDH6: pSAT6-EYFP-N1 融合蛋白的黄色荧光主要分布在叶绿体上，说明 SaNDH6 蛋白定位于叶绿体（图 5），这与亚细胞定位预测结果一致。



35S:YFP 为空载体对照。

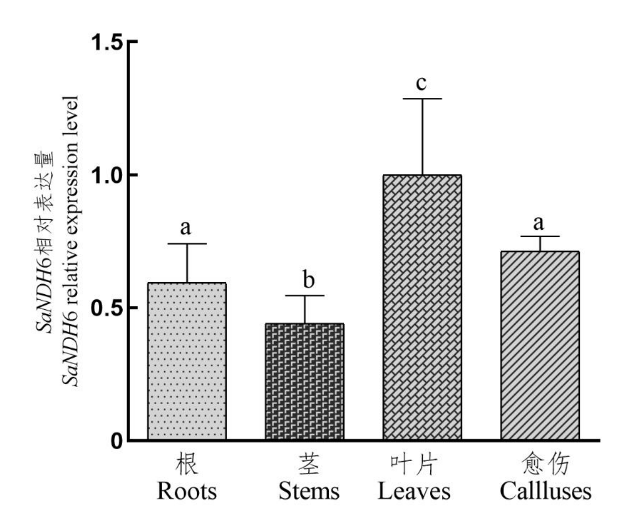
35S:YFP is an empty carrier control.

图 5 SaNDH6 的亚细胞定位

Fig. 5 Subcellular location of SaNDH6

2.4 *SaNDH6* 的组织表达

在不同组织中检测 *SaNDH6* 的表达量，由图 6 可知，*SaNDH6* 在檀香的根、心材、叶片和愈伤组织中均有表达，其中在叶片中的表达量较高，其次为愈伤组织，在其余二种组织中的表达量均相对较低。



不同字母表示显著性差异(P<0.05)。下同。

Different letters indicate significant differences (P<0.05). The same below.

图 6 *SaNDH6* 在檀香不同组织的表达分析

Fig. 6 Relative expression analysis of *SaDNH6* in different tissues of *Santalum album*

2.5 *SaNDH6* 的启动子分析

檀香基因组数据经过注释后，我们提取了 *SaNDH6* 基因起始密码子 ATG 上游 2 000 bp 的启动子序列。经过 PlantCARE 分析发现，其含有大量的光响应元件，如 ACE、AE-box、Box 4、G-Box、GT1-motif、LAMP-element、MRE、TCT-motif 和 chs-CMA1a，说明 *SaNDH6* 的表达主要受光的诱导；同时还发现有一些激素响应元件，如脱落酸（ABA）响应元件

ABRE，MeJA 反应元件 CGTCA-motif 和 TGACG-motif，赤霉素响应元件 P-box，说明 *SaNDH6* 的表达可能也受这些激素的调控；此外，还发现有一些逆境响应元件，如厌氧诱导元件 ARE，防御和胁迫响应元件 TC-rich repeats 等，说明 *SaNDH6* 也可能参与檀香的一些逆境胁迫反应过程（图 7）。

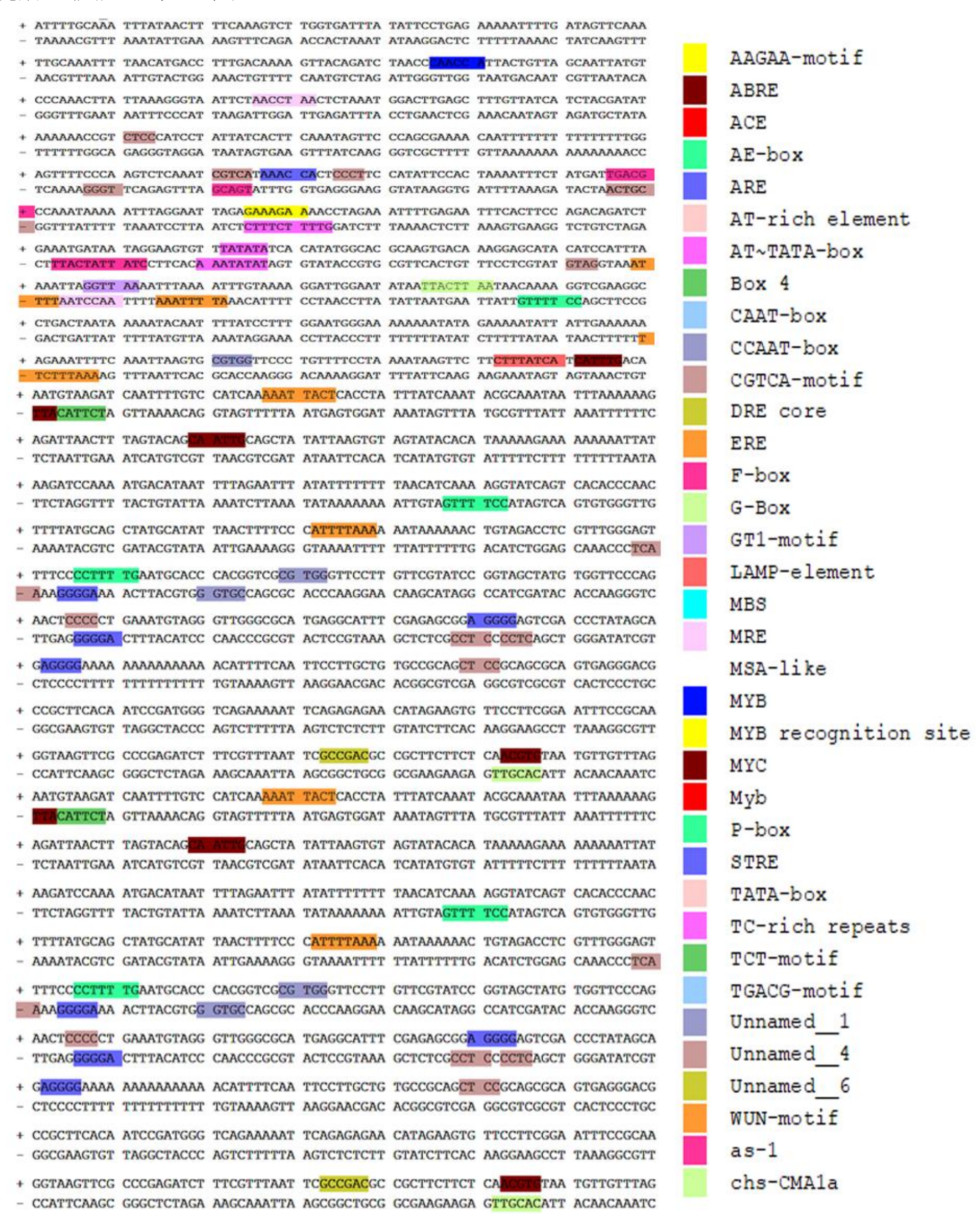


图 7 *SaNDH6* 启动子的顺式作用元件分析

Fig. 7 *Cis*-acting elements analysis of *SaNDH6* promoter

2.6 可能结合 *SaNDH6* 的转录因子分析

通过 PlantRegMap 分析发现（图 8），有 76 个转录因子可能与 *SaNDH6* 启动子结合，其中 ERF 家族转录因子最多，共有 40 个；其次为 B3 类转录因子，共有 13 个；MIKC_MADS 和 AP2 类转录因子分别有 5 个和 4 个；而 FAR1 和 MYB 类转录因子最少，分别只有一个。说明 *SaNDH6* 基因的表达主要受到 ERF 和 B3 类转录因子的直接调控。

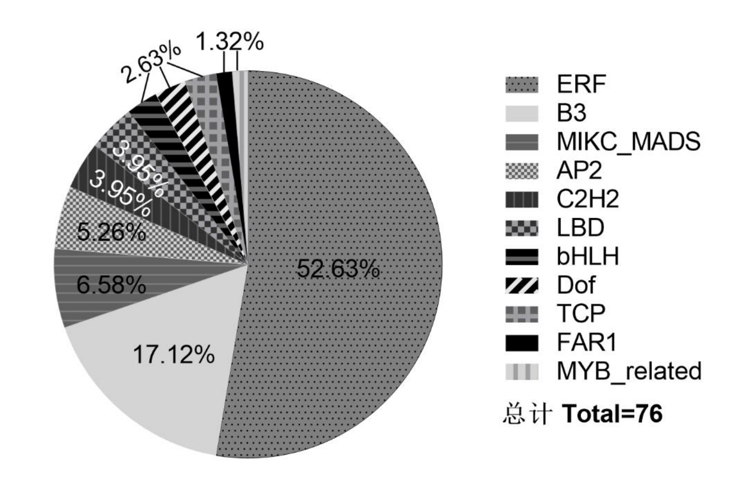


图 8 结合 *SaNDH6* 启动子的转录因子统计

Fig. 8 Statistic analysis of transcription factors binding the *SaNDH6*

2.7 不同激素处理后 *SaNDH6* 的表达分析

SaNDH6 启动子中分别含有激素 MeJA 和 GA 的响应元件，预示着这两种激素可能对 *SaNDH6* 的表达有诱导作用。为了证明这一猜想，我们用 1×10^{-4} mol·L^{-1} 的 MeJA 和 GA_3 分别处理檀香愈伤组织，*SaNDH6* 的表达结果显示（图 9），与 0 h 相比，MeJA 和 GA_3 处理 3 h 后 *SaNDH6* 的表达均出现显著升高，说明 MeJA 和 GA_3 都可以正向诱导 *SaNDH6* 的表达。

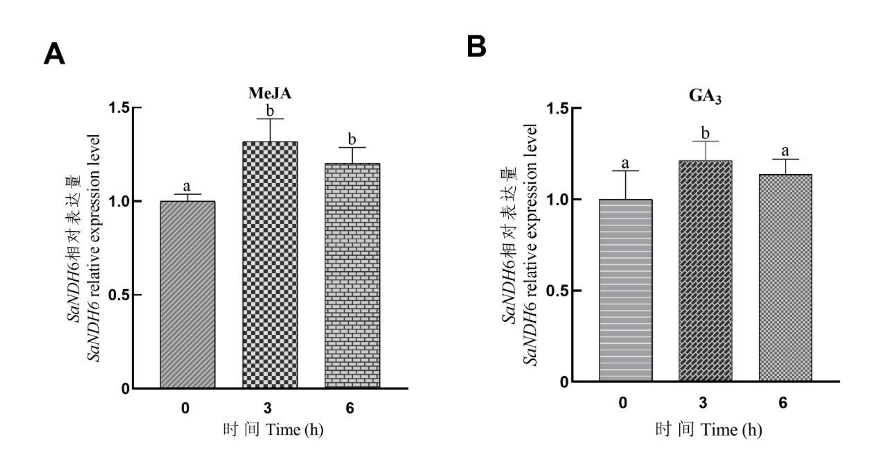


图 9 茉莉酸甲酯(A)和赤霉素(B)处理后 *SaNDH6* 的表达

Fig. 9 Relative expression of *SaNDH6* treated by MeJA (**A**) and GA (**B**) treatments

3 讨论

3.1 *SaNDH6* 在檀香 NDH 复合体中的定位

叶绿体 NDH 脱氢酶是多个亚基组成的内囊体膜蛋白复合物，其包括 11 个叶绿体基因组编码的亚基和至少 19 个核基因组编码的亚基，至少有 16 个基因参与其合成过程（Ifuku et al., 2011; Yamori & Shikanai, 2016）。我们在檀香中克隆了 *SaNDH6*，通过 Blast 搜索发现其与多种植物的 NDH6 亚基具有很高的序列相似性，并且其与木本植物的 NDH6 进化关系较近。序列分析表明 SaNDH6 为疏水蛋白，亚细胞定位显示其定位于叶绿体，说明 SaNDH6 通过定位在叶绿体的内囊体膜上行驶功能。*SaNDH6* 在檀香叶片中的表达量较高，但除叶片之外，其在不含有叶绿体的心材、根和愈伤组织中均有表达，据此我们推测 SaNDH6 是核基因编码的蛋白。

3.2 *SaNDH6* 表达的调控

转录调控在促进或者抑制基因表达中发挥关键的作用，其主要是由基因的启动子和位于启动子中的顺式作用元件所控制的（Hernandez-Garcia & Finer, 2014; Zou et al., 2011）。目前，关于叶绿体 NDH 复合体表达调控的研究鲜有报道。我们通过分析 *SaNDH6* 起始密码子 ATG 上游 2 kb 的启动子序列后发现，*SaNDH6* 启动子中含有大量的光响应元件，说明光对其表达起到主要的调控作用，这也与其主要参与光合作用的功能相一致。同时发现，*SaNDH6* 的表达也受到 GA_3 和 JA 等激素的正向调控。Romanowska（1984）和 Tasi（1985）分别研究表明，外施 GA_3 可以提高一些植物的生长速率和光合效率，说明 GA 可能通过调控 *SaNDH6* 的表达从而参与檀香的光合作用过程。JA 除了特异性地调控植物在昆虫取食和死体营养性病原菌侵染的反应过程外（Wasternack, 2015; Hickman et al., 2017），同时也参与植物的生长发育和抗御非生物胁迫等逆境的反应过程（Qiu et al., 2014; Per et al., 2018）。目前 NDH 复合体参与病原菌侵染等生物胁迫的反应方面的研究很少，但其在抵御非生物胁迫方面已有大量报道（Yamori & Shikanai, 2016），因此我们推测 JA 可能主要通过调控 *SaNDH6* 的表达从而参与檀香对一些非生物胁迫的反应过程，但具体的作用和机制还需探究和验证。

3.3 *SaNDH6* 在逆境胁迫中发挥作用

通过 NDH 的电子传递和依赖于 PGR5/PGRL1 的电子传递之间存在部分功能冗余，在正常生长环境下，NDH 复合体的突变并不能产生明显的表型变化（Munekage, 2004; Yamori & Shikanai, 2016）。但深入研究表明，NDH 复合体在植物抗御多种逆境胁迫中发挥作用。Hibino 等（1996）发现高盐可以特异地诱导耐盐蓝细菌（*Aphanothece halophytica*）循环电子传递蛋白的表达，增加依赖于 NDH 的电子传递，从而使它能够适应高盐环境；Zhao 等（2017）研究证明，在多种环境胁迫下，集胞藻 NDH-1 能够维持 PSI 结构的稳定；Li（2004）等将烟草置于低温（4 ℃）和低光照强度（100 $mol{\cdot}m^{-2}{\cdot}s^{-1}$）环境中，发现 *ndhB* 突变体的最大光化学效率（F_v/F_m）和 PSII 驱动的电子传递效率都显著低于野生型植株，推测低温和弱光环境中依赖于 NDH 的电子传递对光合器官有保护作用； Wang 等（2006）研究了不同温度处理后野生型和 NDH 突变体 *ndhC-ndhK-ndhJ*（DndhCKJ）烟草植株活性氧积累的差异，发现 NDH 通过电子传递提高了 CO_2 的同化作用，从而减少了高温胁迫引起的活性氧的产生。以上研究表明，植物在强/弱光、高/低温、高盐和低湿等逆境下，依赖于 NDH 的电子传递在维持光合系统结构的稳定性、促进 CO_2 的同化、避免内囊体基质的过渡还原、减少 H_2O_2 的产生以及维持正常的光合速率等方面发挥作用。在本研究中，我们发现檀香 *SaNDH6* 启动子中也含有一些参与逆境响应的元件，如 JA 和 ABA 的响应元件、厌氧诱导元件、防御和胁迫响应元件等。其中，MeJA 的响应原件最多，共有 4 个（TGACG-motif 和 CGTCA-motif 分别各有 2 个），其次为与干旱胁迫密切相关的反应原件，共有 3 个（ABRE 2 个，MBS 1 个）。结合前人研究结果我们推测 *SaNDH6* 除了主要进行光合作用外，可能也参与檀香的干旱胁迫等逆境反应过程。

4 结论

本研究克隆了檀香叶绿体 NDH 脱氢酶亚基基因 *SaNDH6*，其编码 303 个氨基酸，定位于叶绿体，与拟南芥叶绿体 NDH 脱氢酶的核基因编码亚基具有较近的进化关系。*SaNDH6* 启动子中含有大量光响应元件、一些激素响应元件和参与逆境胁迫反应的元件，ERF 和 B3 类等转录因子可能直接结合该基因的启动子从而调控其表达，组织表达结果显示该基因在檀香的叶片中表达量较高，同时其表达可以被 MeJA 和 GA_3 显著诱导。

参考文献：

ARMBRUSTER U, RUHLE T, KRELLER R, et al., 2013. The photosynthesis affected mutant68-like protein evolved from a PSII assembly factor to mediate assembly of the chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell, 25(10): 3926-3943.

BALDOVINI N, DELASALLE C, JOULAIN D., 2011. Phytochemistry of the heartwood from fragrant *Santalum* species: a review[J]. Flavour Frag J, 26(1): 7-26.

ENDO T, SHIKANAI T, TAKABAYASHI A, et al., 1999. The role of chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase in photoprotection[J]. Fed Eur Biochem Soc, 457: 5-8.

FAN XY, ZHANG J, LI WJ, et al., 2015. The NdhV subunit is required to stabilize the chloroplast NADH dehydrogenase-like complex in *Arabidopsis*[J]. Plant J, 82(2): 221-231.

HBINO T, LEE BH, RAI AK, et al., 1996. Salt enhances photosystem I content and cyclic electron flow via NAD(P)H Dehydrogenase in the halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica*[J]. Aust J Plant Physiol, 23: 321-330.

HE Z, ZHENG F, WU Y, et al., 2015. NDH-1L interacts with ferredoxin via the subunit NdhS in thermosynechococcus elongatus[J]. Photosynth Res, 126(2-3): 341-349.

HERNANDEZ-GARCIA CM, FINER JJ, 2014. Identification and validation of promoters and *cis*-acting regulatory elements[J]. Plant Sci, 217-218: 109-119.

IFUKU K, ENDO T, SHIKANAI T, et al., 2011. Structure of the chloroplast NADH dehydrogenase-like complex: nomenclature for nuclear-encoded subunits[J]. Plant Cell Physiol, 52(9): 1560-1568.

KOLOSOVA N, MILLER B, RALPH S, et al., 2004. Isolation of high-quality RNA from gymnosperm and angiosperm trees[J]. BioTechniques, 35: 821-824.

MAHESH H B, SUBBA P, ADVANI J, et al., 2018. Multi-Omics driven assembly and annotation of the Sandalwood (*Santalum album*) genome[J]. Plant Physiol, 176(4): 2772-2788.

MUNEKAGE Y, HASHIMOTO M, Miyake C, et al., 2004. Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis[J]. Nature, 429: 579-582.

OHYAMA K., 1996. Chloroplast and mitochondrial genomes from a liverwort, marchantia polymorpha-gene organization and molecular evolution[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 60(1): 16-24.

OTANI T, KATO Y, SHIKANAI T., 2018. Specific substitutions of light-harvesting complex I proteins associated with photosystem I are required for supercomplex formation with chloroplast NADH dehydrogenase-like complex[J]. Plant J, 94(1): 122-130.

PELTIER G, ARO E M, SHIKANAI T., 2016. NDH-1 and NDH-2 plastoquinone reductases in oxygenic photosynthesis[J]. Ann Rev Plant Biol, 67: 55-80.

PENG LW, FUKAO Y, FUJIWARA M, et al., 2009. Efficient operation of NAD(P)H dehydrogenase requires supercomplex formation with photosystem I via minor LHCI in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell, 21(11): 3623-3640.

PER T S, KHAN M I R, ANJUM N A, et al., 2018. Jasmonates in plants under abiotic stresses: crosstalk with other phytohormones matters[J]. Environ Exp Bot, 145: 104-120.

QIU Z, GUO J, ZHU A, et al., 2014. Exogenous jasmonic acid can enhance tolerance of wheat seedlings to salt stress[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 104: 202-208.

RICHARD H, MARCEL C VV, ANJA JH VD, et al., 2017. Architecture and dynamics of the jasmonic acid gene regulatory network[J]. Plant Cell, 29(9): 2086-2105.

ROMANOWSKA E, PARYS E, POSKUTA J., 1984. The effect of light quality and gibberellic acid (GA3) on photosynthesis and respiration rates of pea seedlings[J]. Photosynth Res, 5: 205-214

SHIKANAI T., 2016. Chloroplast NDH: A different enzyme with a structure similar to that of respiratory NADH dehydrogenase[J]. Biochim Biophys Acta, 1857(7): 1015-1022.

SHINOZAKI K, OHME M, TANAK M, et al., 1986. The complete nucleotide sequence of tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression[J]. The EMBO J, 5: 2043-2049.

SINGH C K, RAJ S R, JAISWAL P S, et al., 2015. Effect of plant growth regulators on *in vitro*

plant regeneration of sandalwood (*Santalum album* L.) via organogenesis[J]. Agrofor Syst, 90(2): 281-288.

SIRPIO S, ALLAHVERDIYEVA Y, HOLMSTROM M, et al., 2009. Novel nuclear-encoded subunits of the chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex[J]. J Biol Chem, 284(2): 905-912.

TAKABAYASHI A, ISHIKAWA N, OBAYASHI T, et al., 2009. Three novel subunits of *Arabidopsis* chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase identified by bioinformatic and reverse genetic approaches[J]. Plant J, 57(2): 207-219.

TSAI D S, ARTECA R N., 1985. Effects of root applications of gibberellic acid on photosynthesis and growth in C3 and C4 plants[J]. Photosynth Res, 6: 147-157.

WANG P, DUAN W, TAKABAYASHI A, et al., 2006. Chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase in tobacco leaves functions in alleviation of oxidative damage caused by temperature stress[J]. Plant Physiol, 141(2): 465-474.

WASTERNACK C., 2015. How jasmonates earned their laurels: Past and present[J]. J Plant Growth Regul, 34(4): 761-794.

LI XG, DUAN W, MENG Q, et al., 2004. The function of chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase in tobacco during chilling stress under low irradiance[J]. Plant Cell Physiol, 45(1): 103-108

YAMAMOTO H, PENG L, FUKAO Y, et al., 2011. An Src homology 3 domain-like fold protein forms a ferredoxin binding site for the chloroplast NADH dehydrogenase-like complex in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell, 23(4): 1480-1493.

YAMORI W, SAKATA N, SUZUKI Y, et al., 2011. Cyclic electron flow around photosystem I via chloroplast NAD(P)H dehydrogenase (NDH) complex performs a significant physiological role during photosynthesis and plant growth at low temperature in rice[J]. Plant J, 68(6): 966-976.

YAMORI W, SHIKANAI T., 2016. Physiological functions of cyclic electron transport around photosystem I in sustaining photosynthesis and plant growth[J]. Ann Rev Plant Biol, 67: 81-106.

YAN H, ZHANG Y, XIONG Y, et al., 2018. Selection and validation of novel RT-qPCR reference genes under hormonal stimuli and in different tissues of *Santalum album*[J]. Sci Rep, 8(1): 17511.

YOO S D, CHO Y H, SHEEN J., 2007. *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis[J]. Nat Protoc, 2(7): 1565-1572.

ZHAO J, GAO F, FAN D Y, et al., 2017. NDH-1 is important for photosystem I function of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 under environmental stress conditions[J]. Front Plant Sci, 8: 2183.

ZOU C, SUN K, MACKALUS J D., 2011. *Cis*-regulatory code of stress-responsive transcription in *Arabidopsis thaliana*[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 108(36): 14992-14997.